



北海道公立大学法人  
**札幌医科大学**  
Sapporo Medical University

SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY INFORMATION AND KNOWLEDGE REPOSITORY

Title 論文題目	Cytotoxic Tph-like cells are involved in persistent tissue damage in IgG4-related disease (細胞傷害性 Tph 様細胞は IgG4 関連疾患の持続的な組織傷害に関与する)
Author(s) 著 者	矢部, 勇人
Degree number 学位記番号	甲第 3093 号
Degree name 学位の種別	博士 (医学)
Issue Date 学位取得年月日	2020-03-31
Original Article 原著論文	Modern Rheumatology 2020, in press
Doc URL	
DOI	
Resource Version	Author Edition

## 学位論文の内容の要旨

報 告 番 号	甲第 3093 号	氏 名	矢部 勇人
<p>論文題名</p> <p>Cytotoxic Tph-like cells are involved in persistent tissue damage in IgG4-related disease</p> <p>研究目的</p> <p><u>IgG4 関連疾患 (IgG4-RD) は血清中の IgG4 値の上昇と病変局所での IgG4 陽性形質細胞の浸潤を特徴とする原因不明の疾患である。ステロイドの治療効果が認められているが、減量により再燃を認める症例も多く、病態の解明と新規治療戦略の構築が急務となっている。</u></p> <p><u>2017 年に関節リウマチ患者の滑膜病変において末梢ヘルパー T (Tph) 細胞が増加することが発見された。この Tph 細胞は CXCR5<sup>+</sup>PD-1<sup>hi</sup> と規定される CD4 陽性 T 細胞であり、抗体産生に関わることが分かっている。</u></p> <p><u>また、CX3CR1 はケモカインレセプターの一つとして知られており、ケモカインレセプターとしてだけではなく接着因子としても機能することが分かっている。現在 CX3CR1 の特異的なリガンドである CX3CL1 (Fractalkine) の拮抗薬である抗 CX3CL1 抗体の関節リウマチやクローン病に対する臨床治験が進んでいる。</u></p> <p><u>我々は、これら CX3CR1 や Tph 細胞に着目し、IgG4-RD における機能と役割を明らかにすることを目的として研究を開始した。そして、最終的には IgG4 関連疾患への抗 CX3CL1 抗体の適応拡大や、Tph 細胞を標的とした新規治療の開発を目的としている。</u></p> <p>研究方法</p> <p><u>IgG4-RD 患者や健常者の末梢血や顎下腺を用いた。文書にて同意が得られた 17 名 (男性 6 名、女性 11 名、年齢 <math>67.2 \pm 11.2</math> (35-84) 歳) の IgG4-RD 患者を研究対象とした。IgG4-RD の診断には 2011 年に発表された IgG4-RD 包括診断基準を用いた。IgG4-RD 患者末梢血中の Tph 細胞の CX3CR1 発現率の検討のため、フローサイトメトリーを使用し解析を行った。セルソーターによりソートした CX3CR1 陽性 Tph 細胞や CX3CR1 陰性 Tph 細胞や濾胞ヘルパー T (Tfh) 細胞の遺伝子発現の解析のためにリアルタイム PCR を行った。セルソーターには Aria2 を使用した。IgG4-RD の病変局所の CX3CL1 の発現を確認するため免疫染色を行った。</u></p> <p><u>In vitro</u> での機能解析として CX3CL1 リコンビナントを用いた細胞傷害性蛋白の放</p>			

出実験、ヒト顎下腺や血管内皮細胞に対しての細胞傷害アッセイを行った。

#### 研究成績及び考察

IgG4-RD 患者の末梢血中の Tph 細胞では CX3CR1 が健常者と比較して有意に高発現していた。IgG4-RD 患者末梢血中から CX3CR1 陽性 Tph 細胞をソートし細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 関連遺伝子について検討したところ、GZMA や PRF1 といった CTL 関連遺伝子が CX3CR1 陰性 Tph 細胞や Tfh 細胞と比較して高発現していた。このことから IgG4-RD において CX3CR1 陽性 Tph 細胞が IgG4-RD で健常者よりも増加し細胞傷害に関連した機能を持つことが考えられた。

IgG4-RD 患者の病変局所の顎下腺では CX3CL1 が正常顎下腺よりも強く発現していた。中でも血管内皮細胞や導管上皮での発現が特に強く観察された。

Tph 細胞における CX3CR1 陽性率と各種臨床パラメーターの相関を検討したところ、罹患臓器数と IgG4 responder index との間に有意な相関を認め、CX3CR1 陽性 Tph 細胞が IgG4-RD における病変の拡大に関わる可能性が示唆された。

CX3CR1 陽性 Tph 細胞の機能解析を目的として、in vitro でヒト末梢血の CD4 T 細胞に CX3CL1 リコンビナントの添加を行った。結果、培養上清から細胞傷害蛋白である GranzymeA, GranzymeB を CX3CL1 リコンビナントを添加する群で添加しない群と比較して多く検出することが分かった。また、正常顎下腺上皮細胞や血管内皮細胞をターゲット細胞とし、CX3CR1 陽性または陰性の CD4 T 細胞をエフェクター細胞とした細胞傷害アッセイでは CX3CR1 陽性 CD4 T 細胞は CX3CR1 陰性 CD4 T 細胞と比較して高い細胞傷害能を持つことを発見した。また、Granzyme や Perforin の拮抗薬として知られる Concanamycin を添加したところ、CX3CR1 陽性 CD4 T 細胞の細胞傷害能は抑制された。

これらの実験結果から、IgG4-RD において CX3CR1 と CX3CL1 の相互作用を介した CX3CR1 陽性 Tph 細胞の組織中への遊走、病変組織での CX3CR1 陽性 Tph 細胞による Granzyme, Perforin 経路を介した細胞障害という一連の反応が起こっていると考えられた。そして、これらの反応が IgG4-RD における組織傷害や線維化という病態を説明できる可能性があると考えられた。

#### 結論

IgG4-RD において CX3CR1 陽性 Tph 細胞は細胞傷害や組織傷害に関わり、新たな治療標的となりうる。

論文審査の要旨及び担当者

(令和2年3月31日授与)

報告番号	甲第 3093 号	氏 名	矢部 勇人
論文審査 担 当 者	主査 教授 高橋 弘毅	副査 教授 一宮 慎吾	
	委員 教授 高橋 裕樹	委員 教授 高野 賢一	

論文題名	Cytotoxic Tph-like cells are involved in persistent tissue damage in IgG4-related disease. (細胞傷害性 Tph 様細胞は IgG4 関連疾患における慢性組織傷害に関与する)
結果の要旨 <p>IgG4 関連疾患 (IgG4-RD) は高 IgG4 血症と病変局所の IgG4 陽性形質細胞の浸潤を呈する慢性炎症性疾患である。我々は IgG4-RD における Tph 細胞の機能を解明する目的でケモカイン受容体の CX3CR1 に着目し、CX3CR1 陽性 Tph 細胞の IgG4-RD における機能的意義を検討した。IgG4-RD 患者と健常者の末梢血、IgG4-RD と正常の顎下腺組織を用いた。フローサイトメトリー、定量 PCR、ELISA、cytotoxicity assay による解析を行った。また、CX3CR1 のリガンドである CX3CL1 の病変部位における発現を免疫染色で検討した。</p> <p>その結果、IgG4-RD 患者の末梢血中ではグランザイム A を高発現する CX3CR1 陽性 Tph 細胞が増加していた。機能解析では CX3CR1 陽性 Tph 細胞に細胞傷害 T 細胞関連遺伝子が高発現していた。また、IgG4-RD 患者の顎下腺組織では正常顎下腺と比較して CX3CL1 が高発現していた。</p> <p>IgG4-RD では CX3CR1 陽性 Tph 細胞が病変局所に遊走し、組織傷害を引き起こすことで病態形成に関わっている可能性が示唆された。今後、CX3CR1 陽性 Tph 細胞が IgG4-RD の新規治療ターゲットとして機能する可能性があると考えられた。</p>	